

氏 名	宮城 篤
学 位 の 種 類	博士（理学）
学 位 記 番 号	博乙第323号
学 位 授 与 の 日 付	平成20年9月26日
学 位 授 与 の 要 件	論文博士（学位規則第4条第2項）
学 位 授 与 の 題 目	高速AFMによる生体分子の動態イメージング
論文審査委員（主査）	安藤 敏夫（理工研究域・教授）
論文審査委員（副査）	福岡 剛士（フロンティアサイエンス機構・特任准教授）， 内橋 貴之（理工研究域・准教授），小椋 光（熊本大学・教授）， 森川 耿石（大阪大学・教授）

Abstract

I had observed several proteins using high-speed atomic force microscopy (AFM), such as Dynein, Myosin and Actin filament, Gro-EL/ES and FACT (facilitates chromatin transcription). In particular, I observed the heterodimeric FACT protein that is predicted to have large Intrinsically disordered (ID) regions in each subunit. ID regions of proteins have been recognized to be involved in biological processes such as transcription, translation, and cellular signal transduction. Despite the important roles of ID regions, effective methods to directly observe the thin and flexible structures have not been available. Successive AFM images of FACT on a mica surface, captured at rates of 5-17 frames s⁻¹, clearly revealed two distinct tail-like segments that protrude from the main body of FACT and are fluctuating in position. Using deletion mutants of FACT, we identified these tail segments as the two major ID regions predicted from the amino acid sequences. Their mechanical properties estimated from the AFM images suggested that they have more relaxed structures than random coils. These observations demonstrate that this state-of-the-art microscopy method can be used to characterize unstructured protein segments that have been difficult to visualize using other experimental techniques.

生体内でさまざまな機能を司るタンパク質は、機能発現の際にその構造を変化させるものが多い。それらの機能発現機構を完全に解明するためには、ダイナミックな構造形態の変化と機能の関係を知らなければならない。そのためには、機能している最中のタンパク質分子の姿を直接動画で観察できることが最も望ましい。そのような観察を実現するためには“高い空間分解能”と“生理現象を捉えるに有効な時間軸”を併せ持つ革新的な技術の開発が必要である。

その原子間力顕微鏡（AFM: Atomic Force Microscope）は水溶液中に存在する生きたタンパク質をナノ解像度で観察することを可能にした唯一の顕微鏡である。しかしながら、従来型のAFMは1枚の画像を得るために分オーダーの時間を要するが、走査速度を飛躍的に向上させることで、高い空間分解能と高速イメージングを併せ持つ観察技術を実現することが出来る。我々の研究室では、AFMの高速化に長年取り組み、これまでにさまざまなデ

バイスの改良が行われ、最新の結果では 0.03 秒で一枚の画像取得が可能になっている。

本研究では、高速 AFM をさまざまなタンパク質に適用し、装置の問題点の発見と改良 AFM 観察のための試料調整方法の最適化を行った。その結果、ミオシン基板を滑り運動するアクチンフィラメントや、ATP 加水分解で駆動されるダイニン c の動態、微小管上を移動する細胞質ダイニン、FACT protein の ID 領域の観察などに成功した。

ダイニン c は ATP(Adenosine Tri-Phosphate)の加水分解により、図 1 の模式図に示した Stem の角度が Head,Stalk に対して変化することでレールタンパク質である微小管上をスライド運動することが知られている。ATP 存在下でダイニン c の高速 AFM 観察を行った結果、Stem と Stalk 間の角度が時間的に変化する様子を捉えることが出来た。角度変化のヒストグラムを解析したところ、137 度と 164 度の二つのピークをもつことが分かった。これらの角度は ATP が無い状態と ADP-Pi のアナログを用いて電子顕微鏡で観察された結果¹⁾と良く一致していた。これらから、高速 AFM で観察された Stem と Stalk の角度変化は、ATP の加水分解によって引き起こされた構造変化であると考えられる。

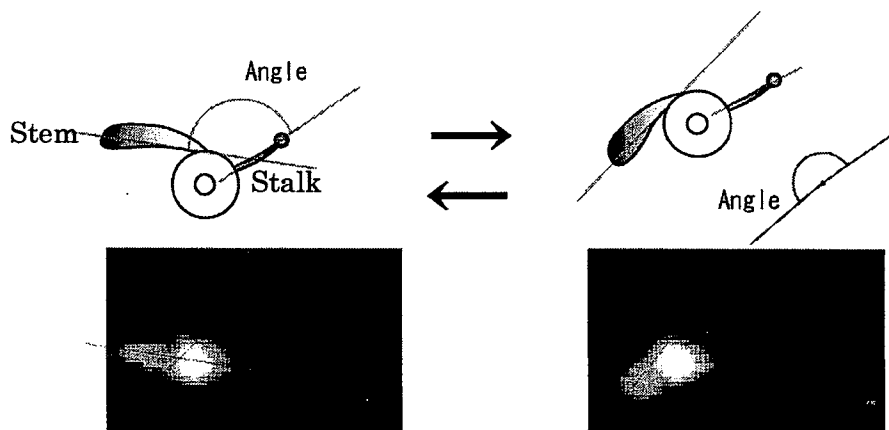


図 1 ダイニン c の Stem-Stalk 間の角度が変化するようすが観察できる。

次に、ダイニンが ATP の加水分解により実際に微小管上を運動している様子を観察した。図 2 に高速 AFM による連続画像を示す (時間間隔は 564 ミリ秒)。酵母細胞質ダイニンはキネシンと異なり、複数のプロトフィラメントに渡って運動することが知られている²⁾。フレーム 1-3 では、2 本観察されている微小管のうち、下側の微小管に結合していたダイニンが右側に移動しており、フレーム 4 で上側の微小管に移動している。フレーム 5 で再び下側の微小管に戻り、再び右側に移動していく様子が観察された。この様に、酵母脂肪質ダイニンは複数のプロトフィラメントだけではなく、複数の微小管を積極的に利用して移動していることが分かる。隣の微小管に乗り換える際は、微小管の極性に関係なく乗り換えることも分かっており、実際に逆平行な微小管上で円を描くように走る様子も観察された。

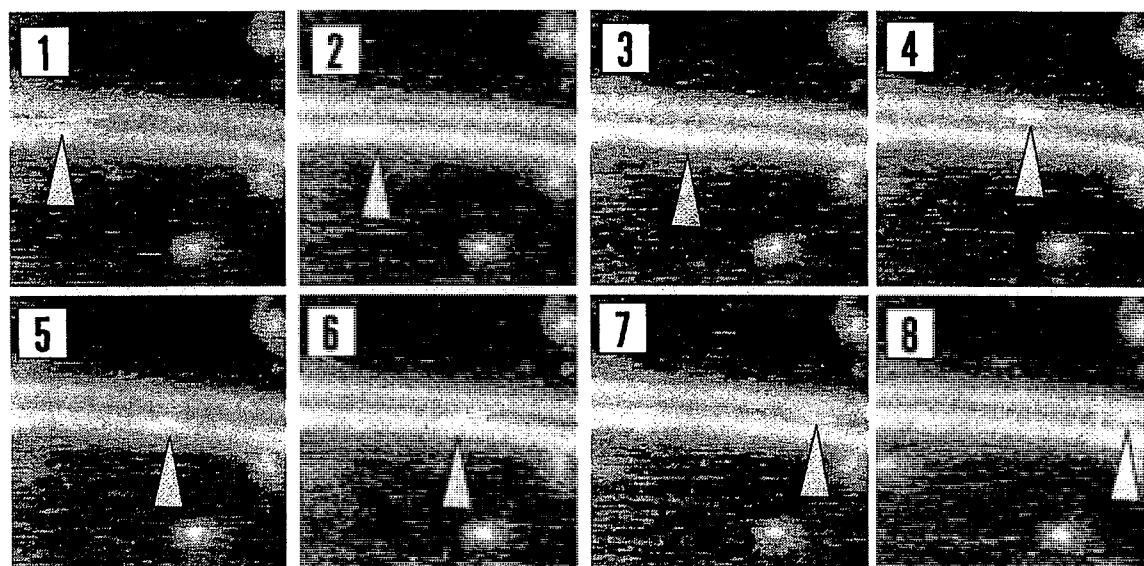


図2 緑の矢印はダイニンの位置を表す。フレーム4で完全に隣の微小管に移動している。しかし、そのまま前進していることから、二つの微小管は極性がそろっており、画面右側がマイナス端である。

タンパク質には特定の構造がない ID(Intrinsically Disorder)領域と呼ばれる構造を持つものが多く存在し、結晶構造解析法や電子顕微鏡法では高次構造の観察や解析を行なうことが困難である。一方、高速 AFM は時間的に変動して行く構造の観察も可能であることから、タンパク質の ID 領域の観察に適していると期待される。今回、クロマチンのリモデリングファクターである FACT(Facilitate Chromatin Transcription)の観察を行なった。FACT は SSRP1 と SPT16 からなるヘテロダイマーであり、それぞれのサブユニットに ID 領域が予測されている。図 3 (a)は SSRP1 に存在する大きな ID 領域を欠損したミュータントを観察した結果であり、1 本のヒゲ状構造が揺らいでいる様子が確認できた。一方、SPT16 に存在する小さな ID 領域を欠損したミュータントでは図 3 (b)に示すように、(a)の画像に比べて大きなヒゲ状構造を観察することが出来た。これらの結果から、高速 AFM でヒゲ状に観察される構造が FACT の ID 領域に対応していると考えられる。これらの ID 領域は激しくブラン運動しており、イメージングレートが ms 以下でないとその構造は明瞭に捉えられなかった。また、ID 領域の屈曲状態から持続長(persistence length)は 11nm と見積もられ、これから ID 領域のヤング率は 9-58MPa と概算された。一般に構造を持ったタンパク質のヤング率は数 GPa であり、変性タンパク質の場合には数 MPa であることが知られていることから、ID 領域は変性タンパク質に近い機械特性を持つことが分かった。

本研究では高速 AFM の改良と試料調整法の最適化を行い、様々なタンパク質系に適用した。その結果、モータータンパク質の ATP 加水分解に同期した構造変化やレールタンパク質に沿って運動する様子を直接観察できるようになり、さらに、これまで有効な手法がなかった ID 領域の構造観察と機械特性の解析を行なえるようになった。

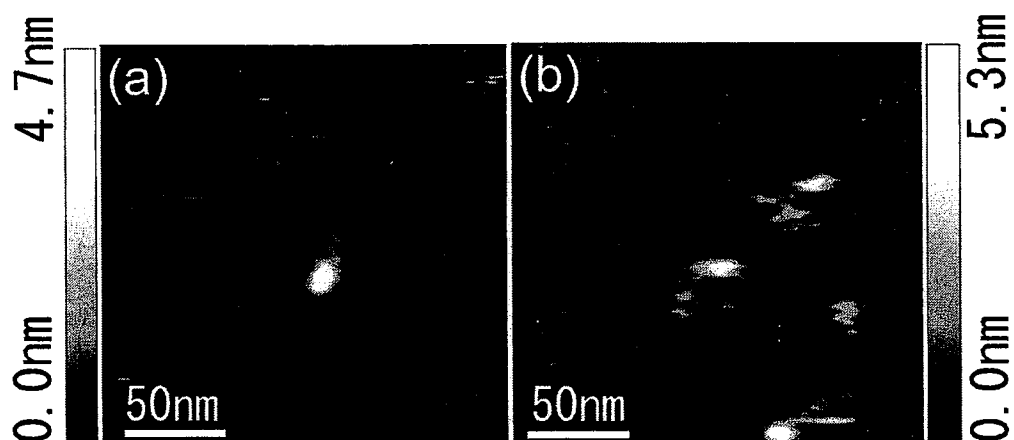


図3 FACT 欠損ミュータントのAFM画像。FACTはSSRP1とSPT16からなるヘテロダイマーであり、SSRP1はSPT16よりも大きなID領域が予想されている。(a)はSSRP1欠損ミュータント、(b)はSPT16欠損ミュータントのAFM画像である。

¹⁾ Burgess, S.A., Walker, M.L., Sakakibara, H., Oiwa, K., Knight, P.J. 2004 *Journal of Structural Biology* 146 (1-2), pp. 205-216

²⁾ Wang, Z., Sheetz, M.P. 1999 *Cell Structure and Function* 24 (5), pp. 373-383

学位論文審査結果の要旨

ダイナミクスは生体分子の重要な属性のひとつである。ダイナミックな構造変化や他分子とのダイナミックな相互作用を通して1分子レベルで機能する。それ故、分子メカニズムの解明にとって、個々の分子の動的振る舞いを観察することは重要且つ直接的である。しかし、従来の手法ではナノメータの解像度で生体分子を直接見つつその動的振る舞いを追跡することは全く不可能であった。本研究は、高速原子間力顕微鏡（高速AFM）装置の問題点を、観察を通して探るとともに、開発された装置を生体分子観察に有効に利用する手法を開発し、生体分子の機能解明を追求した研究である。装置開発初期においては、イメージング実験を通して装置の本質的な問題点を明らかにし、それを装置開発に有効にフィードバックすることにより装置開発を正しい方向に導いた。また、高速AFMと光分解反応を活用したトランジェント法を組み合わせた手法の開発を行い、機能発現と密接に関係した構造変化をブラウン運動から区別して捉えることに成功した。性能の向上した高速AFMを用いて実際に機能動態を捉えられることをいくつかのモータタンパク質系で証明するとともに、クロマチンのリモデリング因子であるFACTタンパク質については、他の手法では解析不可能な一定の構造をもたない不規則構造の可視化に世界で初めて成功し、その不規則構造の力学特性の定量化まで行った。以上の研究は、高速AFMによる生体分子の機能解明という新しい分野を切り拓いたという点で高く評価できる内容であり、博士（理学）の学位に十分値すると本論文審査委員会は判断した。